

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考としてください。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

食品に残留する農薬等の成分である物質の

試験法開発事業報告書

アミトラズ試験法（畜産物）

アミトラズ試験法（畜産物）検討結果

[緒言]

1. 目的

アミトラズは、1970年代初頭にイギリスのブーツ社により開発された殺虫剤（殺ダニ剤）であり、薬剤にダニが接触することで効力を発揮する。作用機構は、オクトパミンレセプターに作用して cAMP の過剰生産を引き起こし、リン酸化と脱リン酸化のバランスを乱すと考えられている。

日本では 1975 年 5 月 7 日に農薬登録されている。その後 1985 年 10 月 22 日にみかんのロウムシ類に対して、2003 年 12 月 17 日にかんきつに適用拡大された。本原体の所有権は、現在はアスタライフサイエンス株式会社が有している。

動物用医薬品としては、国内ではイヌのマダニ駆除剤として使用されている。国外においても EU 諸国、中東、南アフリカ、アルゼンチン、ニュージーランド等で使用されている。

旧薬事法に基づき、みつばち寄生ダニ（ミツバチヘギイタダニ）の駆除を目的として承認申請がなされた。

本検討においては、薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、畜産物中のアミトラズ試験法の開発を行った。

なお、今回検討対象としたアミトラズは、アミトラズ及び *N*-2,4-ジメチルフェニル-*N'*-メチルホルムアミジン（アミトラズ代謝物 B）をアミトラズ含量に換算したものの和に残留基準が設定されている※。

※平成 21 年 5 月 8 日付け食安発第 0508001 号

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

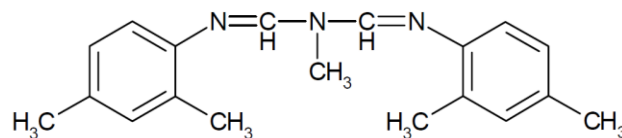
分析対象化合物

アミトラズ

IUPAC 名： *N,N'*-[(methylimino) dimethyldiylidene]di-2,4-xylylidine

CAS 名： *N'*-(2,4-dimethylphenyl)-*N*-[(2,4-dimethylphenyl)imino]methyl]-*N*-methylmethanimidamide

構造式：



分子式： $C_{19}H_{23}N_3$

分子量： 293.41

溶解度：水 9.4×10^{-5} g/L (25.5°C)

ほとんどの有機溶媒に可溶 アセトン、トルエン、キシレン >300 g/L

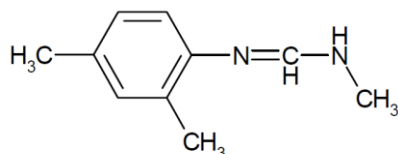
分配係数： $\log P_{ow}=5.5$ (25°C)

pKa： 4.2

安定性：加水分解 DT₅₀ (25°C) 2.1 時間 (pH5)、22.1 時間 (pH7)、25.5 時間 (pH9)

N-2,4-ジメチルフェニル-*N'*-メチルホルムアミジン (以下「代謝物 B」とする)

構造式：



分子式：C₁₀H₁₄N₂

分子量：162.23

外観：黄白色固体

融点：53.4-74.6°C

溶解性：水に難溶

安定性：アルカリ性で不安定。塩酸塩として安定。

出典：残留農薬分析法 2002年版 (ソフトサイエンス社)

3. 基準値 (案)

牛の筋肉：0.09 ppm

牛の脂肪：0.2 ppm

牛の肝臓、腎臓及び食用部分：0.4 ppm

豚の筋肉：0.09 ppm

豚の脂肪、肝臓、腎臓及び食用部分：0.4 ppm

その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉及び脂肪：0.2 ppm

その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓、腎臓及び食用部分：0.4 ppm

乳：0.02 ppm

はちみつ：0.2 ppm

[実験方法]

1. 試料

すべて東京都内の小売店で購入した。また、試料の調製方法を以下に記載した。

1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切りした後、200 g を量り採りエタノール及び 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (1 : 1) 混液 100 g を加え、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、細切りした後、200 g を量り採りエタノール及び 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (1 : 1) 混液 100 g を加え、フードプロセッサーを用いて均一化した。

3) 牛の肝臓

試料を細切した後、200 g を量り採り、エタノール及び 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (1 : 1) 混液

100 g を加え、フードプロセッサーを用いて均一化した。

4) 牛乳

よく混合して均一化した。

5) はちみつ

百花蜜を使用し、40℃以下で加温して溶かしてからよく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

アミトラズ標準品：純度 99.0%、融点 86.8℃（富士フイルム和光純薬（株）製）

代謝物 B 塩酸塩標準品：純度 98.0%（富士フイルム和光純薬（株）製）

アセトニトリル、アセトン、エタノール：残留農薬試験用（関東化学（株）製）

メタノール：LC/MS 用（関東化学（株）製）

水酸化ナトリウム：特級（関東化学（株）製）

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：LC/MS 用（富士フイルム和光純薬（株）製）

珪藻土カラム：InertSep K-solute（5 mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

ミニカラム：InertSep C18（1,000 mg/6 mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

ミニカラム：InertSep PSA（500 mg/3 mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

エタノール及び 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液（1：1）混液

8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 mL 及びエタノール 100 mL を混合した。

標準原液

アミトラズ標準品 10.0 mg を精秤し、アセトンで 10 mL に溶解してアミトラズ 1000 mg/L 溶液を調製した。

代謝物 B 塩酸塩標準品 33.9 mg を精秤し、アセトンで 50 mL に溶解して代謝物 B 553.6 mg/L（アミトラズとして 1000 mg/L）溶液を調製した。なお、以降の代謝物 B 濃度はアミトラズ換算値とする。

検量線用標準溶液

アミトラズ及び代謝物 B 標準原液を混合してアセトニトリル及びメタノール（1：1）混液で適宜希釈し、0.0000125～0.00075 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液

アミトラズ及び代謝物 B 標準原液を混合してメタノールで希釈し、0.1, 0.2, 0.9, 2 及び 4 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：マルチディスパーサー PB-95（シャフト：HG-2）（SMT COMPANY 社製）

フードプロセッサー：MK-K58（パナソニック（株））

濃縮装置：有機溶媒回収装置 V-703（BUCHI 社製）

遠心分離器：ユニバーサル冷却遠心機 5930（久保田商事（株）製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	API4000QTRAP	SCIEX
LC	Prominence LC 20A	（株）島津製作所

データ処理	Analyst Software	SCIEX
-------	------------------	-------

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件																								
カラム	Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス (株) 製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.20																							
注入量 (μL)	10																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>25.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	5.0	90	10	15.0	0	100	25	0	100	25.1	90	10	35	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	90	10																						
5.0	90	10																						
15.0	0	100																						
25	0	100																						
25.1	90	10																						
35	90	10																						
MS 条件																								
測定モード	SRM(選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	ESI (+)																							
キャピラリー電圧 (V)	5500																							
脱溶媒温度 (°C)	500																							
ネブライザーガス	窒素、30 psi																							
脱溶媒ガス	窒素、50 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	アミトラズ +294.2→163.1 [DP : 36 (V)、CE : 21 (eV)] 代謝物 B +163.1→122.0 [DP : 81 (V)、CE : 25 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	アミトラズ +294.2→122.0 [DP : 36 (V)、CE : 43 (eV)] 代謝物 B +163.1→107.1 [DP : 81 (V)、CE : 35 (eV)]																							
保持時間 (min)	アミトラズ 18.4 代謝物 B 13.5																							

5. 定量

アミトラズ及び代謝物 B 標準原液をアセトニトリル及びメタノール(1:1)混液で希釈して 0.0000125、0.000025、0.0000375、0.00005、0.0000625、0.000075、0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 10 μL を LC-MS/MS に注入して、得られた ピーク面

積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 10 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のアミトラズ及び代謝物 B の含量を算出した。

アミトラズにおいて、定量限界値相当及び牛乳の基準値相当の添加濃度を評価する場合には 0.0000125~0.000075 mg/L の濃度で検量線を作成し、牛乳以外の基準値相当の添加濃度を評価する場合には 0.000125~0.00075 mg/L の濃度で検量線を作成した。また、代謝物 B の測定については定量限界値相当及び基準値相当のいずれの場合も 0.000125~0.00075 mg/L の濃度で検量線を作成した。なお、基準値相当の添加試料については検量線の範囲内に収まるよう、試験溶液を表 1 に示すと通りの倍率で希釈した。

表 1 基準値相当の添加回収試験における試験溶液の希釈倍率

食品名	アミトラズ	代謝物 B
牛の筋肉	1 倍	10 倍
牛の脂肪	2 倍	20 倍
牛の肝臓	5 倍	50 倍
牛乳	2 倍	2 倍
はちみつ	2 倍	20 倍

6. 試験溶液の調製

1) 添加試料の調製

牛の筋肉、脂肪及び肝臓：試料 10.0 g に試料の 1/2 量のエタノール及び 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液（1：1）混液を加え、磨砕均一化して調製する（調製試料）。これに添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛乳及びはちみつ：試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

2) 抽出

a 牛の筋肉、脂肪及び肝臓の場合

調製試料 15.0 g を 250 mL 遠心管に採り、メタノール 100 mL を加えホモジナイズし、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した後、上清を採った。残留物にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上清を合わせ、メタノールを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 2 mL を分取して多孔性ケイソウ土カラム [Inert Sep K-solute (5 mL)] に負荷し、10 分放置した後、アセトニトリル 30 mL で溶出した。この溶出液を 100 mL 分液ろうとに採り、*n*-ヘキサン 30 mL を加えて 5 分間振とうした。アセトニトリル層を 100 mL ナスフラスコに移し、*n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、5 分間振とうした。上記と同様の操作を更に 1 回繰り返した後、アセトニトリル層を上記の 100 mL ナスフラスコに合わせ、40℃以下でアセトニトリルを除去した。この残留物にメタノール 2 mL を加えて溶解した後、アセトニトリル 2 mL を加えて振り混ぜた。

b 牛乳及びはちみつの場合

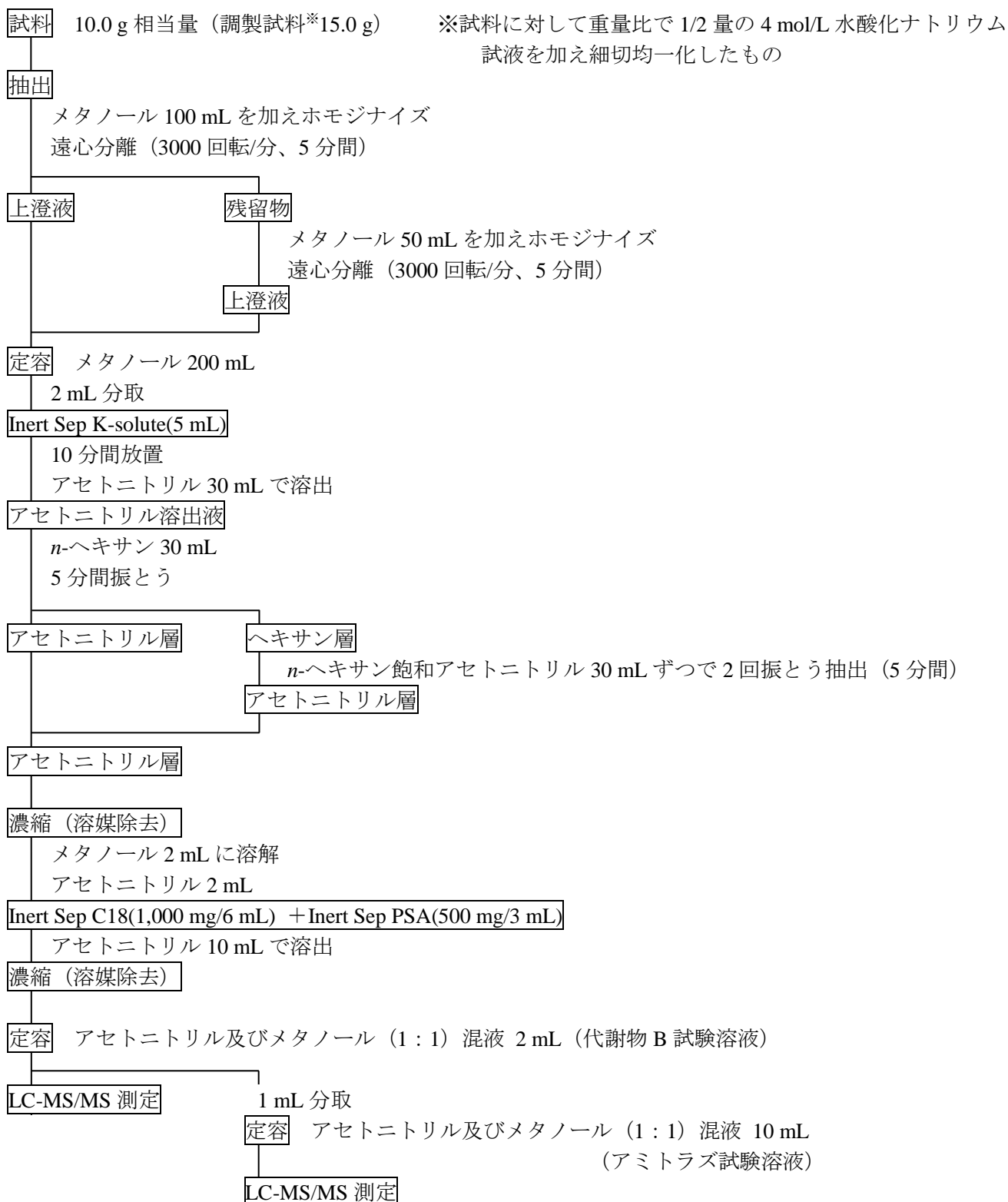
試料 10.0 g を 250 mL 遠心管に採り、8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 2.5 mL 及びメタノール 100 mL を加えホモジナイズし、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した後、上清を採った。残留物にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上清を合わせ、

メタノールを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 2 mL を分取して多孔性ケイソウ土カラム [Inert Sep K-solute (5 mL)] に負荷し、10 分放置した後、アセトニトリル 30 mL で溶出した。この溶出液を 100 mL 分液ろうとに採り、*n*-ヘキサン 30 mL を加えて 5 分間振とうした。アセトニトリル層を 100 mL ナスフラスコに移し、*n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、5 分間振とうした。上記と同様の操作を更に 1 回繰り返した後、アセトニトリル層を上記の 100 mL ナスフラスコに合わせ、40°C 以下でアセトニトリルを除去した。この残留物にメタノール 2 mL を加えて溶解した後、アセトニトリル 2 mL を加えて振り混ぜた。

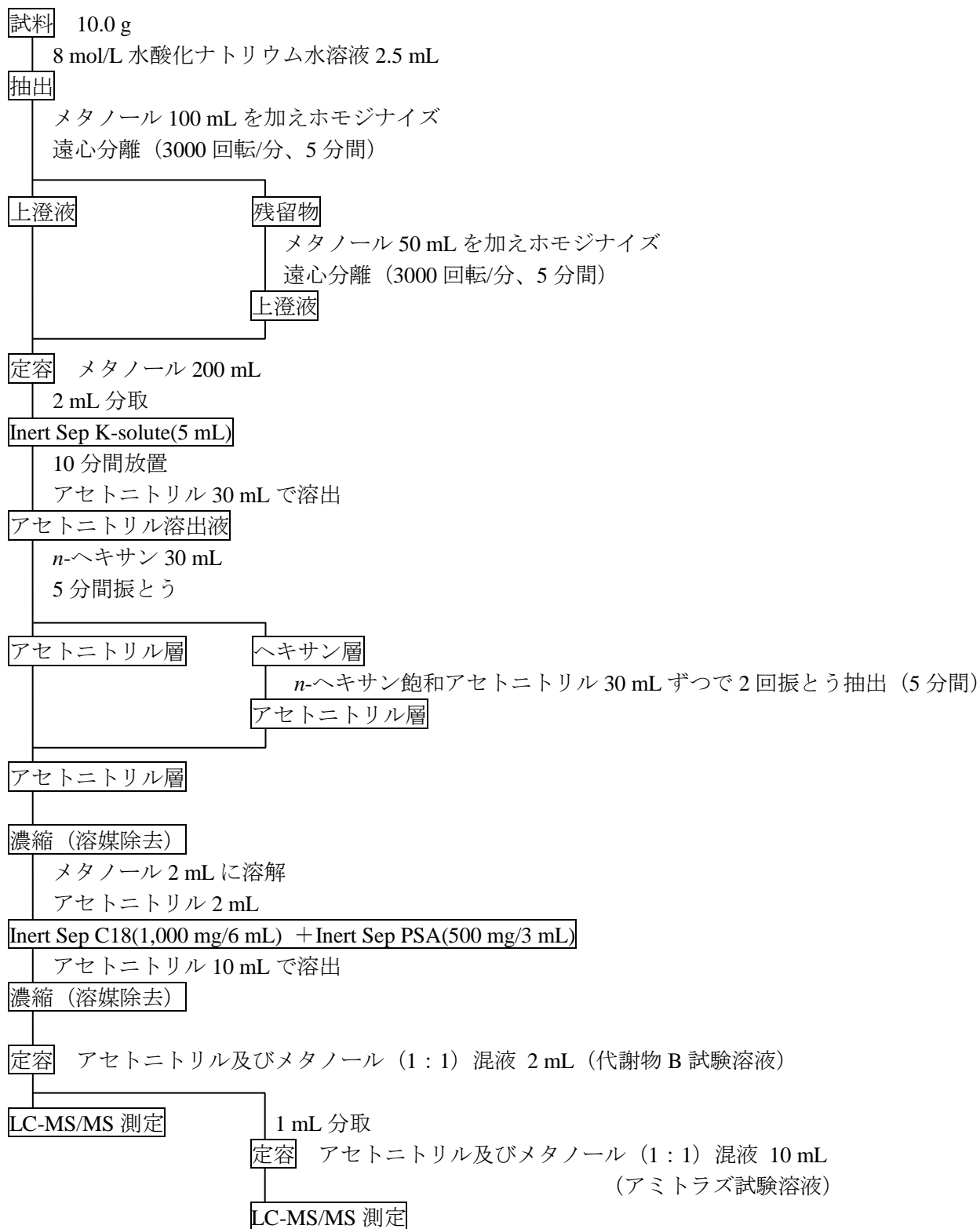
3) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Inert Sep C18 (1,000 mg/6 mL)] 及び PSA ミニカラム [Inert Sep PSA (500 mg/3 mL)] にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた C18 ミニカラムの下部に PSA ミニカラムを接続し、(1) で得られた溶液を注入し、溶出液を採った。さらにアセトニトリル 10 mL を注入し溶出液を採り、先の溶出液と合わせて 40°C 以下で濃縮し溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液に溶解し正確に 2 mL としたものを代謝物 B 試験溶液とした。また、代謝物 B 試験溶液を 1 mL 分取し、アセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液を加えて正確に 10 mL としたものをアミトラズ試験溶液とした。

[分析法フローチャート (牛の筋肉、脂肪及び肝臓)]



[分析法フローチャート (牛乳及びはちみつ)]



7. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 0.2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS 条件の検討

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ESI (+) モードではアミトラズのプロトン付加分子である m/z 294.2 $[M+H]^+$ 及び代謝物 B のプロトン付加分子である m/z 163.1 $[M+H]^+$ が検出されたが、ESI (-) モードではアミトラズ及び代謝物 B に由来するイオンが検出されなかったことから、測定には ESI (+) モードを用いることとした。このときのマススペクトルを図 1 及び図 2 に示した。

次に ESI (+) モードで、5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (1 : 1) 混液を移動相としてフローインジェクションにて測定を行った。アミトラズのプロトン付加分子 (m/z 294.2 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 3 及び図 4 に示した。 m/z 163.1 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 122.0 が検出された。また、代謝物 B のプロトン付加分子 (m/z 163.1 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 5 及び図 6 に示した。 m/z 122.0 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 107.1 が検出された。

以上のことから、ESI (+) モードで測定し、アミトラズについては m/z +294.2→163.1 を定量用、 m/z +294.2→122.0 を定性用の測定イオンとし、代謝物 B については m/z +163.1→122.0 を定量用、 m/z +163.1→107.1 を定性用の測定イオンとした。

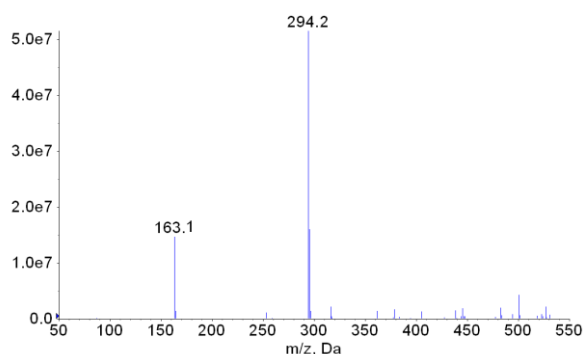


図 1 アミトラズ標準溶液のマススペクトル
スキャン範囲：50～550amu
測定条件：ESI+, DP=36 V
(DP : declustering potential)

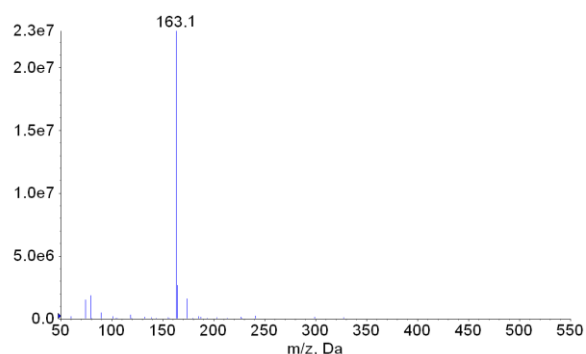


図 2 代謝物 B 標準溶液のマススペクトル
スキャン範囲：50～550amu
測定条件：ESI+, DP=81 V

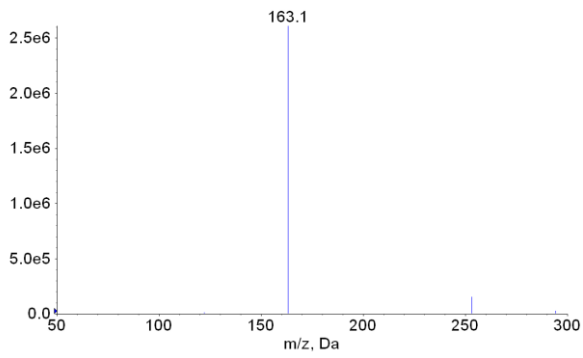


図 3 アミトラズの

プロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 294.2

測定条件 : ESI+, DP=36 V, CE= 21 eV

(CE=collision energy)

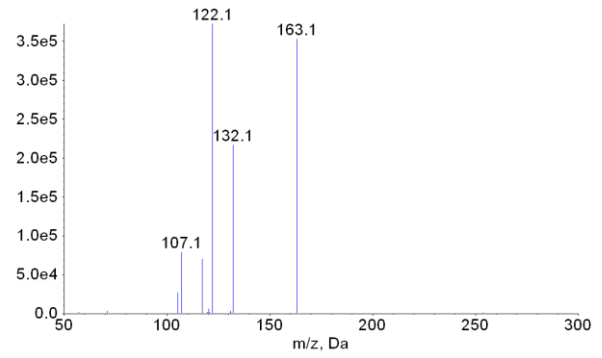


図 4 アミトラズの

プロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン : m/z 163.1

測定条件 : ESI+, DP=36 V, CE= 43 eV

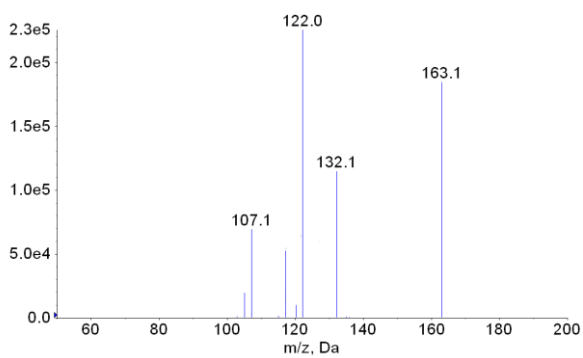


図 5 代謝物 B の

プロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 163.1

測定条件 : ESI+, DP=81 V, CE=25 eV

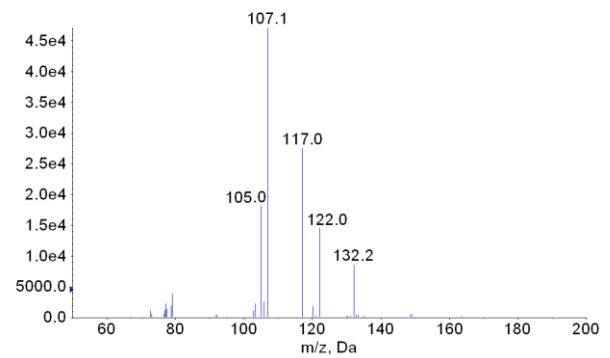


図 6 代謝物 B の

プロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン : m/z 163.1

測定条件 : ESI+, DP=81 V, CE=35 eV

2) LC 条件の検討

分析カラムについて Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm) を用いて検討を行ったところ、良好な保持とピーク形状が得られたので、測定には Inertsil ODS-4 を用いることにした。

移動相条件について、酢酸アンモニウム溶液 - メタノールについて、添加剤の3濃度 (2、5 及び 10 mmol/L) について検討した結果 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 - 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を用いた場合に最も良好な感度が得られたので 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 - 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を移動相として用いることにした。

3) 検量線

図 7~9 に検量線の例を示した。0.0000125~0.000075 mg/L 及び 0.000125~0.00075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれの分析対象化合物においても 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

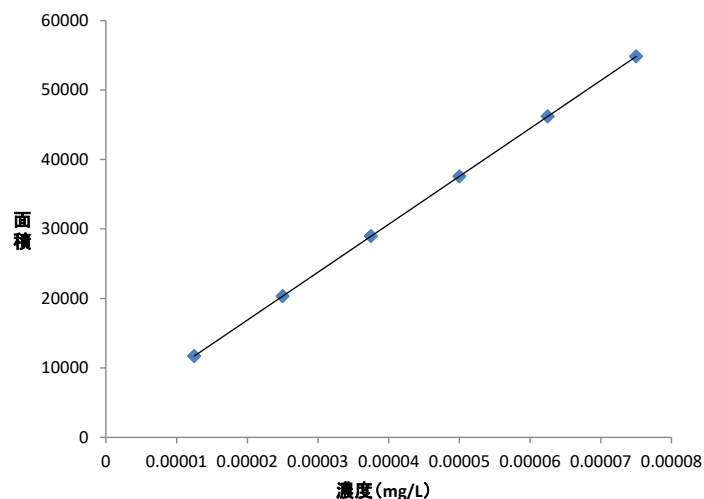


図 7 アミトラズ検量線の例 (定量限界値相当及び牛乳の基準値相当評価用)

濃度範囲 : 0.0000125~0.000075 mg/L

$$y = 689807915x + 3082 \quad r^2 = 1.0000$$

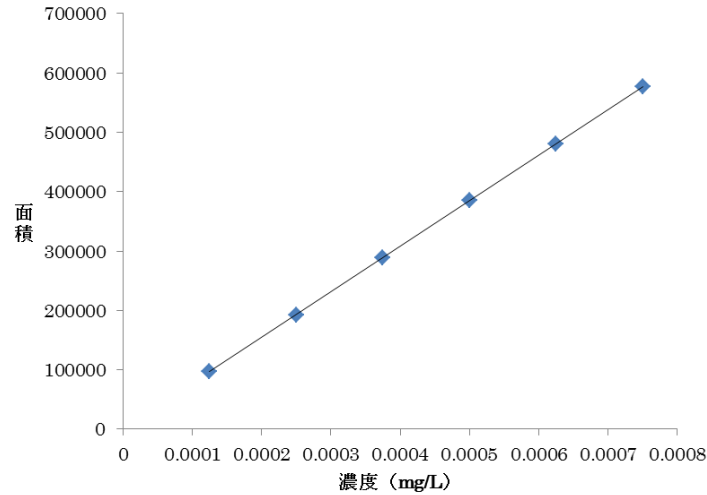


図 8 アミトラズ検量線の例（牛乳以外の基準値相当評価用）

濃度範囲：0.000125~0.00075 mg/L

$$y = 769199294x + 290 \quad r^2 = 1.0000$$

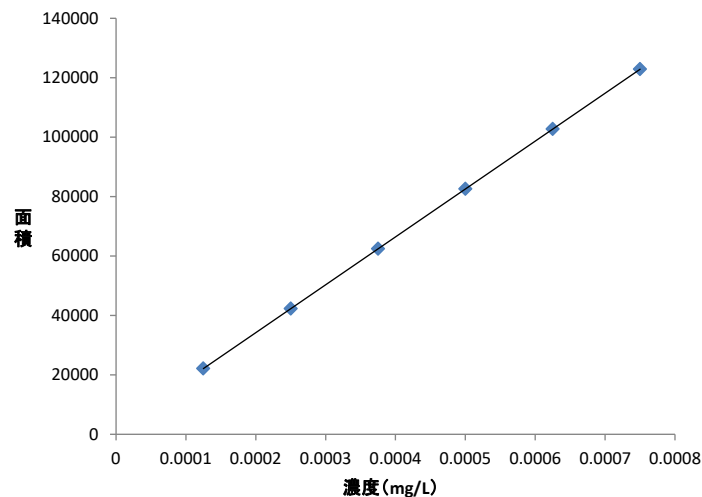


図 9 代謝物 B 検量線の例

濃度範囲：0.000125~0.00075 mg/L

$$y = 161178549x + 1989 \quad r^2 = 1.0000$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 試料調製方法の検討

牛の肝臓及び脂肪を用いて、アセトン抽出における回収率を確認した。牛の肝臓については、試料 10.0 g にアミトラズ及び代謝物 B 10 mg/L（アセトン溶液）1 mL を添加して 30 分間放置した。牛の脂肪については試料 10.0 g を 40℃以下で融解し、アミトラズ及び代謝物 B 10 mg/L（アセトン溶液）1 mL を添加して再凝固させてから 30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、遠心分離し上清を分取した。残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離した。上清を合わせ 200 mL に定容し、ここから 1 mL を分取してメタノールを加えて 10 mL に定容し、試験溶液とした。結果を表 2 に示した。牛の脂肪では良好な回収が得られたが、牛の肝臓では回収率が低下し

た。

表2 アセトン抽出における回収率 (%)

化合物	牛の脂肪	牛の肝臓
アミトラズ	109.6	42.3
代謝物 B	99.7	36.6

添加量：10 µg

肝臓に含まれる酵素によりアミトラズが分解されている可能性を考え、アルカリを添加することにより酵素を失活させる方法を検討した。

牛の肝臓 10.0 g に 0.5、1、2 及び 4 mol/L の水酸化ナトリウム試液 5 g を添加し、よく攪拌した。これに、アミトラズ及び代謝物 B 10 µg/mL アセトン溶液) 1 mL を添加して 30 分間放置した後、上記と同様に操作し、試験溶液を調製した。結果を表 3 に示した。2 mol/L 以上で回収率が良好になったことから、4 mol/L の水酸化ナトリウム試液を 5 g 添加することとした。

表3 添加する水酸化ナトリウム濃度の検討 (%)

化合物	水酸化ナトリウム濃度(mol/L)				
	0 (無添加)	0.5	1	2	4
アミトラズ	42.3	57.0	79.3	97.2	100.5
代謝物 B	36.6	72.4	92.4	97.4	95.8

試料：牛の肝臓

添加量：10 µg

同様に、牛の脂肪、筋肉、牛乳及びはちみつにおいても水酸化ナトリウム添加が可能であるか確認を行った。結果を表 4 に示した。いずれの試料においても良好な回収が得られた。

表4 牛の脂肪、筋肉、牛乳及びはちみつにおける水酸化ナトリウム添加検討結果 (%)

化合物	牛の脂肪	牛の筋肉	牛乳	はちみつ
アミトラズ	99.9	113.3	104.6	96.8
代謝物 B	99.8	97.5	103.2	95.4

添加量：20 µg

以上の結果より、牛の筋肉、脂肪及び肝臓については試料に対して重量比で 1/2 量の 4 mol/L 水酸化ナトリウム試液を添加して前処理を行い、牛乳及びはちみつについては試料 10.0 g に 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 2.5 mL を加えて抽出を行うこととした。

2) 抽出溶媒の検討

調製試料を用いて、アセトン及びメタノールによる抽出の検討を行った。結果を表 5 に示した。いずれの溶媒においても良好に回収されているが、アセトンで抽出した場合には、精製操作を行ってもアミトラズの測定においてマトリックスの影響が大きくあらわれたため、抽出溶媒にはメタノールを

用いることとした。

表5 牛の脂肪、肝臓、牛乳及びはちみつにおける抽出検討結果 (%)

化合物	アセトン				メタノール			
	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	はちみつ	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	はちみつ
アミトラズ	99.9	113.3	104.6	96.8	96.3	103.4	102.3	92.7
代謝物 B	99.8	97.5	103.2	95.4	98.5	92.8	100.6	96.2

添加量 : 20 µg

3) 脱脂方法の検討

①多孔性ケイソウ土カラム [Inert Sep K-solute (5 mL)]

4 mol/L 水酸化ナトリウム試液 5 g にアミトラズ及び代謝物 B 0.05 mg/L のメタノール溶液を 1 mL 添加し、メタノールを加えて正確に 200 mL とした。ここから 2 mL を分取して Inert Sep K-solute (5 mL) に負荷して 10 分間放置した。ここにアセトニトリルを 10 mL ずつ注入して溶出率を確認した。結果を表 6 に示した。アミトラズ、代謝物 B とともに 30 mL で全量溶出されたことから、アセトニトリル 30 mL で溶出を行うこととした。

表6 Inert Sep K-solute (5 mL) による脱脂の検討 (%)

化合物	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	計
アミトラズ	70.3	29.8	0.3	0	100.4
代謝物 B	32.1	66.2	0.8	0	99.1

溶出溶媒 : アセトニトリル

添加量 : 0.05 µg

②アセトニトリル/ヘキサン分配

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配について検討した。*n*-ヘキサン 30 mL にアミトラズ及び代謝物 B 0.1 mg/L のアセトン溶液を 1 mL 添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回抽出を行った結果を表 7 に示した。3 回の抽出操作でほぼ全量回収されたことから、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出することとした。

表7 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討結果 (%)

化合物	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			ヘキサン 30 mL	計
	30 mL (1 回目)	30 mL (2 回目)	30 mL (3 回目)		
アミトラズ	66.9	23.1	8.7	0	98.8
代謝物 B	90.0	7.9	0.7	0	98.6

添加量 : 0.1 µg

以上の結果より、脱脂方法として多孔性ケイソウ土カラムによる方法及びアセトニトリル／ヘキサン分配による方法のいずれも適用可能であったが、どちらか一方のみではアミトラズの測定においてマトリックスの影響が大きくあらわれたため、多孔性ケイソウ土カラムによる精製を行った後、アセトニトリル／ヘキサン分配を行うこととした。

4) カラム精製の検討

①負荷液の検討

実試料を用いて検討を行った場合、アセトニトリル／ヘキサン分配後に溶媒除去を行った際に白い析出物が生じた。この析出物はアセトニトリルに不溶であり、カラム負荷液をアセトニトリル溶液とした場合には代謝物 B の回収が低下した。また、メタノールには可溶であるが、カラム負荷液をメタノール溶液とした場合にはアミトラズにおけるマトリックス影響が大きくあらわれた。そこで、カラム精製を行う際には、アセトニトリル／ヘキサン分配後の溶液を溶媒除去した後、残留物にアミトラズを溶解させるためにメタノール 2 mL を加えて溶解し、ここにマトリックスの影響を小さくするためにアセトニトリル 2 mL を加えて混合したものをカラムに負荷することとした。

②Inert Sep C18 (1,000 mg/6 mL)

Inert Sep C18 (1,000 mg/6 mL) にアミトラズ及び代謝物 B を負荷し、アセトニトリル 10 mL ずつを注入して溶出率を確認した。結果を表 8 に示した。アミトラズ、代謝物 B とともにアセトニトリル 20 mL で全量溶出された。

表 8 Inert Sep C18 (1,000 mg/6 mL) における溶出挙動 (%)

化合物	0 - 10 mL	10 - 20 mL	20 - 30 mL	計
アミトラズ	112.2	0	0	112.2
代謝物 B	93.6	3.3	0	96.9

添加量：1 µg

③Inert Sep PSA (500 mg /3 mL)

Inert Sep PSA (500 mg /3 mL) にアミトラズ及び代謝物 B を負荷し、アセトニトリルを 10 mL ずつ注入して各分画を分取し、溶出率の確認を行った。結果を表 9 に示した。アミトラズ、代謝物 B とともにアセトニトリル 10 mL で全量溶出された。

表 9 Inert Sep PSA (500 mg /3 mL) からの溶出状況 (%)

化合物	0 - 10 mL	10 - 20 mL	20 - 30 mL	計
アミトラズ	105.2	0	0	105.2
代謝物 B	97.2	0	0	97.2

添加量：1 µg

④Inert Sep C18 (1,000 mg/6 mL) 及び Inert Sep PSA (500 mg /3 mL) 連結カラム

Inert Sep C18 (1,000 mg/6 mL) 及び Inert Sep PSA (500 mg /3 mL) 連結カラムにアミトラズ及び代謝物 B 0.25 µg/mL (アセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 溶液) 4 mL を負荷し、アセトニトリル

を 5 mL ずつ注入して分画を分取した。結果を表 10 に示した。アミトラズ及び代謝物 B は C18-PSA 連結カラムからアセトニトリル 10 mL でほぼ全量溶出された。

表 10 C18-PSA 連結カラムからの溶出状況 (%)

化合物	負荷 (4 mL)	0 - 5 mL	5 - 10 mL	10 - 15 mL	計
アミトラズ	22.7	76.0	0.9	0	99.6
代謝物 B	43.3	57.3	1.1	0	101.7

添加量 : 1 µg

以上の結果より C18 ミニカラム及び PSA ミニカラムによる精製では、C18-PSA 連結カラムにアセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液 4 mL で負荷して溶出液を分取し、更にアセトニトリル 10 mL で溶出を行い、溶出液を合わせることにした。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳及びはちみつの 5 食品を試料に用いて、実験方法の「7. 試験溶液の調製」に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100% 相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図 10~19 に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 20 に示した。

1) 選択性

選択性の検討結果を表 11 に示した。検討を行ったいずれの試料においても、アミトラズ及び代謝物 B の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 11 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ¹⁾						選択性の評価 ³⁾	備考		
					評価対象濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク試料			マトリックス添加標準溶液 ²⁾				面積(高さ)比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)
アミトラズ	牛の筋肉	0.01	0.09	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	27570	26890	27230	0.000	○	
		0.01	0.2	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	27980	28360	28170	0.000	○	
		0.01	0.4	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	18790	17260	18025	0.000	○	
		0.01	0.02	基準値	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	52170	53460	52815	0.000	○	
		0.01	0.2	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	27928	28678	28303	0.000	○	
代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.09	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	53700	54420	54060	0.000	○	
		0.01	0.2	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	63080	64660	63870	0.000	○	
		0.01	0.4	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	40520	40540	40530	0.000	○	
		0.01	0.02	基準値	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	74380	73490	73935	0.000	○	
		0.01	0.2	定量限界	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	62650	58360	60505	0.000	○	

¹⁾ ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて経燻注入を行う。)

²⁾ 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。

³⁾ 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表 12 に示した。真度はアミトラズでは 75.4~99.8%、代謝物 B では 83.7~103.9%、併行精度はアミトラズでは 0.6~8.9%、代謝物 B では 0.3~6.2% であり、いずれも目標値を満足した。また、S/N 比はアミトラズでは 30.4~78.6、代謝物 B では 21.8~44.5 であり、S/N ≥ 10 を満足した。

表 12 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ¹⁾	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ²⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値	
アミトラス	牛の筋肉	0.01	0.09	0.01	S/N	557844225	-1222	0.9996	97.4	102.8	95.6	100.8	96.7	98.7	3.1	28.0	32.7	30.4		
						267900603	-4496	0.9999	82.5	82.2	97.7	96.3	97.4	91.2	8.9	—	—	#DIV/0!		
		0.01	0.2	0.01	S/N	689807915	3082	1.0000	77.6	77.9	86.8	78.2	78.0	79.7	5.0	37.5	36.2	36.9		
						384599647	290	1.0000	100.0	99.8	100.2	98.8	100.0	99.8	0.6	—	—	#DIV/0!		
		0.01	0.4	0.01	S/N	440096749	3359	0.9999	78.4	77.3	74.6	74.4	72.1	75.4	3.3	77.2	62.5	69.9		
						361114345	7113	0.9997	84.7	83.8	82.8	81.2	83.1	83.1	1.6	—	—	#DIV/0!		
	0.01	0.02	0.01	S/N	572873444	5616	0.9999	93.6	92.1	92.8	96.1	96.2	94.2	2.0	41.5	29.9	35.7			
					292045932	11792	0.9996	93.5	88.4	88.0	90.1	87.0	89.4	2.9	—	—	#DIV/0!			
	牛の脂肪	0.01	0.2	0.01	S/N	669488892	1869	0.9999	83.8	88.7	88.7	97.6	97.7	91.3	6.7	91.7	65.5	78.6		
						202397793	3356	0.9999	109.0	90.8	94.7	92.1	90.5	95.4	8.1	—	—	#DIV/0!		
		0.01	0.09	0.01	S/N	94226656	2525	0.9996	97.5	107.9	99.8	100.6	96.8	100.5	4.4	43.8	43.6	43.7		
						93381818	1560	0.9999	94.2	92.5	91.7	99.1	101.8	95.9	4.6	—	—	#DIV/0!		
0.01		0.2	0.01	S/N	119256201	4237	1.0000	90.7	83.8	88.1	97.8	95.8	91.2	6.2	27.9	24.0	25.9			
					161178549	1989	1.0000	84.1	84.7	84.5	84.5	84.3	84.4	0.3	—	—	#DIV/0!			
牛の肝臓	0.01	0.4	0.01	S/N	102889737	2071	0.9995	84.6	80.8	81.4	87.3	84.2	83.7	3.1	30.3	27.6	29.0			
					169900724	959	0.9999	86.2	84.5	95.8	95.4	93.5	91.1	5.9	—	—	#DIV/0!			
	0.01	0.02	0.01	S/N	89617575	2488	1.0000	96.4	100.1	98.0	102.6	98.0	99.0	2.4	22.5	21.1	21.8			
					92125364	3540	0.9999	106.5	104.2	104.5	101.6	102.7	103.9	1.8	—	—	#DIV/0!			
	0.01	0.2	0.01	S/N	126755536	2482	0.9997	90.5	90.4	98.9	97.0	98.8	95.1	4.6	49.0	40.0	44.5			
					154218744	1150	0.9999	91.3	90.1	102.6	98.3	97.7	96.0	5.4	—	—	#DIV/0!			

*1 S/Nを求める必要がある場合には、『S/N』と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク (Max.) 及び最小値を与えるピーク (Min.) のそれぞれのS/N比を求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 13 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比はアミトラスでは 0.79~1.00、代謝物 B では 0.96~1.12 であり、牛の肝臓ではアミトラスにおける試料マトリックスの測定への影響がみられたが、それ以外ではほとんど影響はみられなかった。

添加回収試験における真度を表 13 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 14 に示した。補正真度はアミトラスでは 89.6~102.6%、代謝物 B では 85.3~96.2%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも良好な結果が得られた。

表 13 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ¹⁾ (mg/L)	ピーク面積 ²⁾						備考			
							面積又は高さの別	ブランク ³⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液		ピーク面積比 ⁵⁾		
									n=1	n=2	平均	n=1			n=2	平均
アミトラス	牛の筋肉	0.01	0.09	0.01	0.00005	面積	0	27570	26890	27230.0	27670	27700	27685.0	0.98		
						面積	0	227000	229000	228000.0	230000	230400	230200.0	0.99		
		0.01	0.2	0.01	0.00005	面積	0	27980	28360	28170.0	32110	31120	31615.0	0.89		
						面積	0	364900	356400	360650.0	363000	361300	362150.0	1.00		
		0.01	0.4	0.01	0.00005	面積	0	18790	17260	18025.0	23150	22510	22830.0	0.79		
						面積	0	246200	239500	242850.0	278700	265700	272200.0	0.89		
	牛の脂肪	0.01	0.02	0.01	0.00005	面積	0	27710	26600	27155.0	29050	27100	28075.0	0.97		
						面積	0	52170	53460	52815.0	53640	54000	53820.0	0.98		
		0.01	0.2	0.01	0.00005	面積	0	27928	28678	28303.0	33340	30060	31700.0	0.89		
						面積	0	182100	181700	181900.0	196300	196900	196600.0	0.93		
		代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.09	0.01	0.0005	面積	0	53700	54420	54060.0	47380	48930	48155.0	1.12
								面積	0	52290	50940	51615.0	48300	46290	47295.0	1.09
0.01	0.2		0.01	0.0005	面積	0	63080	64660	63870.0	62690	64450	63570.0	1.00			
					面積	0	76820	74620	75720.0	75990	76890	76440.0	0.99			
0.01	0.4		0.01	0.0005	面積	0	40520	40540	40530.0	41830	42800	42315.0	0.96			
					面積	0	56880	56810	56845.0	56840	56380	56610.0	1.00			
0.01	0.02	0.01	0.0005	面積	0	48120	50160	49140.0	46680	47990	47335.0	1.04				
				面積	0	74380	73490	73935.0	68380	68360	68370.0	1.08				
0.01	0.2	0.01	0.0005	面積	0	62650	58360	60505.0	61000	57000	59000.0	1.03				
				面積	0	67120	68210	67665.0	68450	66770	67610.0	1.00				

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) 及び溶媒で調製した標準溶液 (溶媒標準溶液) を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積 (又は高さ) の比を求める。

表 14 補正真度

分析対象化合物	食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)
アミトラズ	牛の筋肉	0.005	98.7	100.7
		0.09	91.2	92.1
	牛の脂肪	0.005	79.7	89.6
		0.2	99.8	99.8
	牛の肝臓	0.005	75.4	95.4
		0.4	83.1	93.4
	牛乳	0.005	94.2	97.1
		0.02	89.4	91.2
はちみつ	0.005	91.3	102.6	
	0.2	95.4	102.6	
代謝物 B	牛の筋肉	0.005	100.5	89.7
		0.09	95.9	88.0
	牛の脂肪	0.005	91.2	91.2
		0.2	84.4	85.3
	牛の肝臓	0.005	83.7	87.2
		0.4	91.1	91.1
	牛乳	0.005	99.0	95.2
		0.02	103.9	96.2
はちみつ	0.005	95.1	92.3	
	0.2	96.0	96.0	

4. 考察

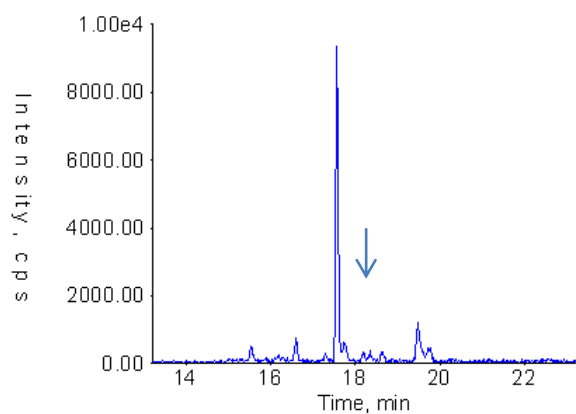
開発した試験法を用いて、牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳及びはちみつの添加回収試験を行った結果、いずれの食品においてもアミトラズ及び代謝物 B の定量を妨害するピークはみられなかった。また、牛の肝臓においてマトリックスの影響がみられたが、真度及び精度は、目標値を満足していたことから、本試験法は、畜産物の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳及びはちみつに適用可能であると判断された。

[結論]

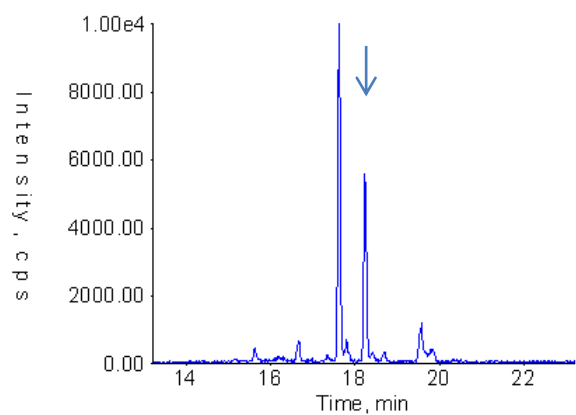
畜産物中のアミトラズ試験法として、アミトラズ及び代謝物 B を試料から塩基性下メタノールで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム及びアセトニトリル／ヘキサン分配で脱脂した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行い、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳及びはちみつに適用した結果、真度はアミトラズにおいて 75.4~99.8%、代謝物 B において 83.7~103.9%、併行精度はアミトラズにおいて 0.6~8.9%、代謝物 B において 0.3~6.2% という良好な結果が得られた。

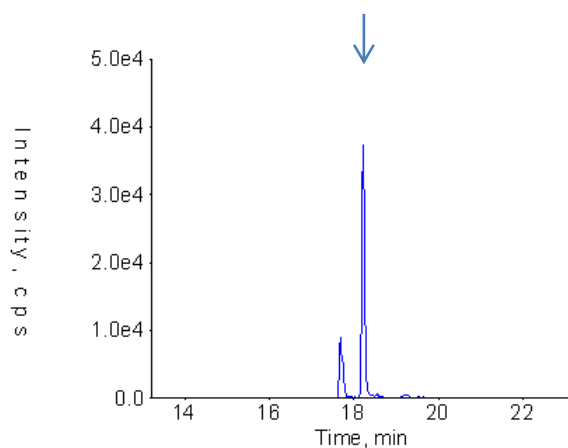
ブランク試料



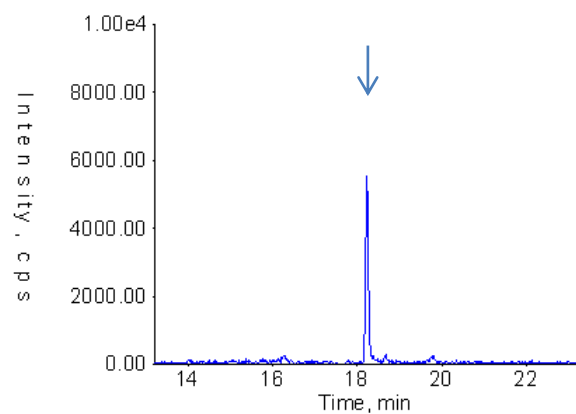
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.09 ppm 相当)



標準溶液 (0.00005 mg/L)



標準溶液 (0.00045 mg/L)

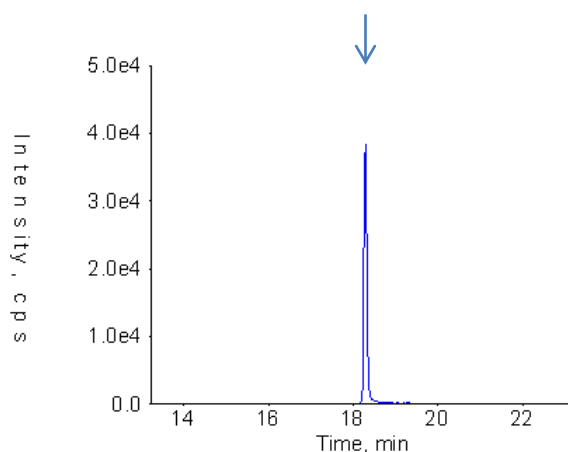
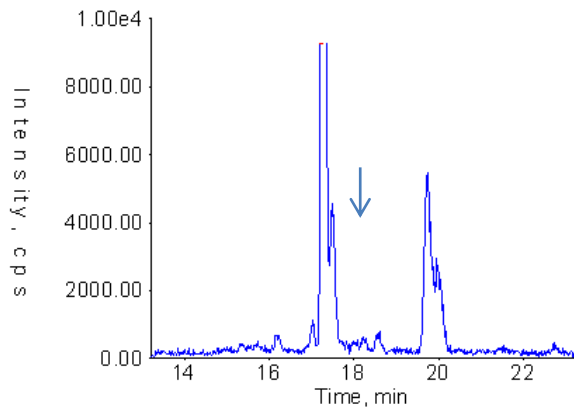
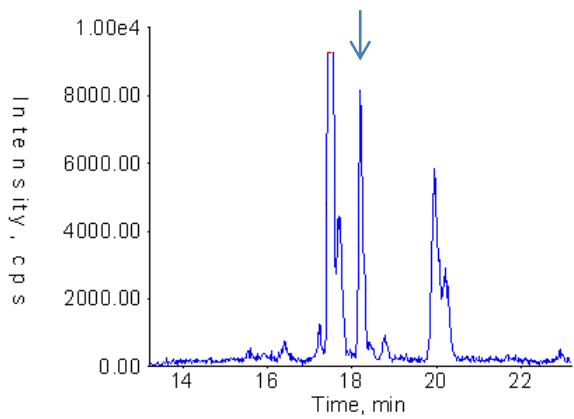


図 10 牛の筋肉の SRM クロマトグラム (アミトラズ m/z +294.2→163.1)

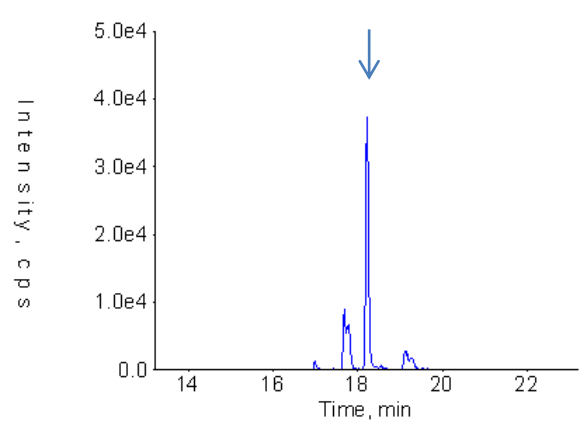
ブランク試料



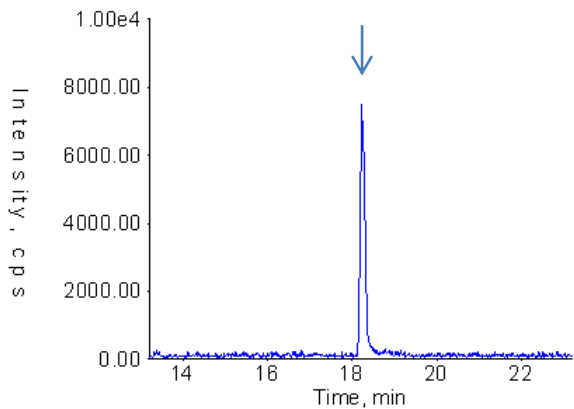
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.00005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

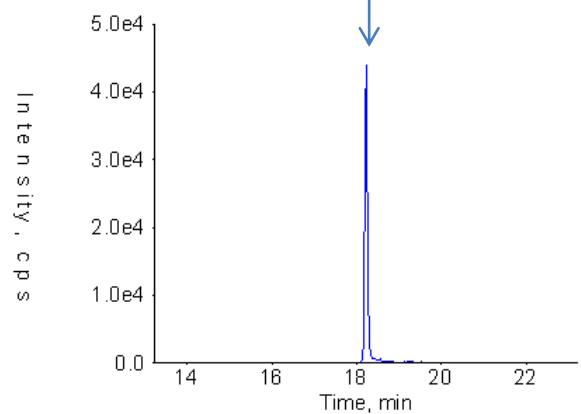
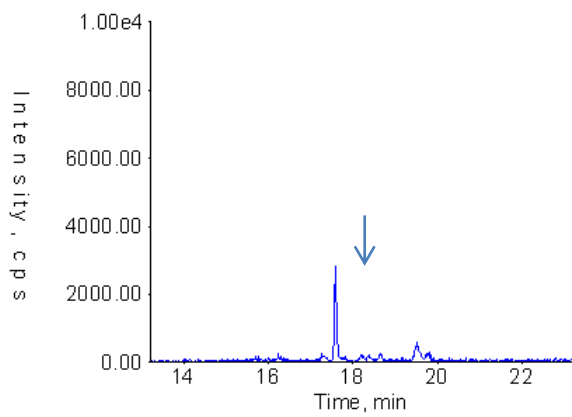
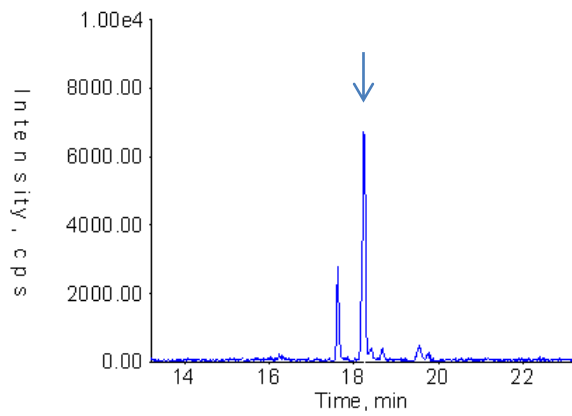


図 11 牛の脂肪の SRM クロマトグラム (アミトラズ $m/z +294.2 \rightarrow 163.1$)

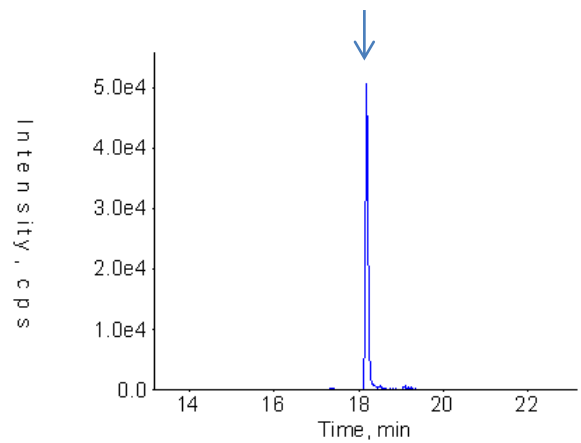
ブランク試料



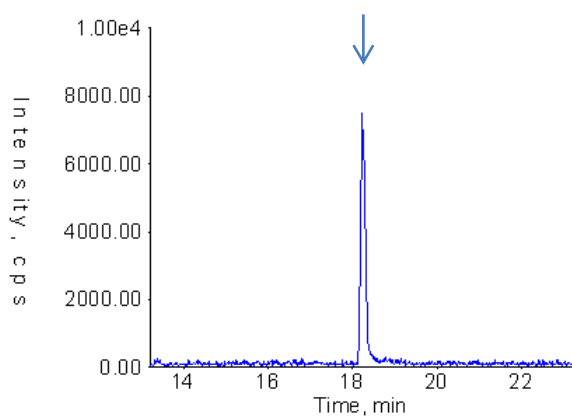
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.4 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.00005 mg/L)



標準溶液 (0.0004 mg/L)

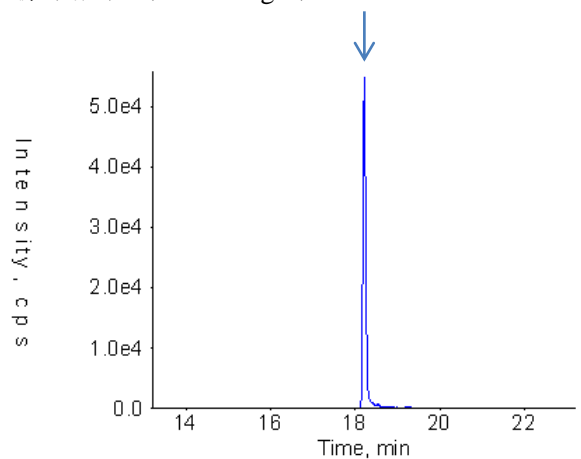
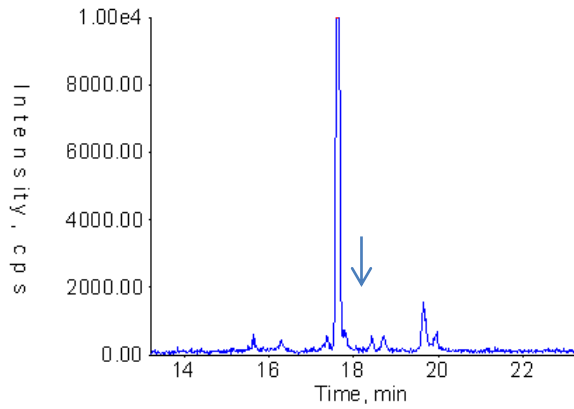
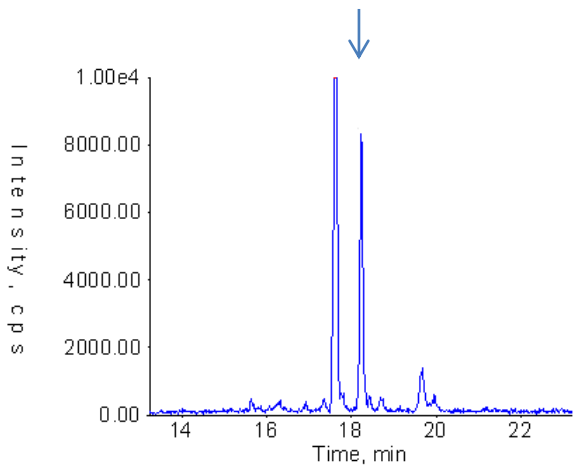


図 12 牛の肝臓の SRM クロマトグラム (アミトラズ $m/z+294.2 \rightarrow 163.1$)

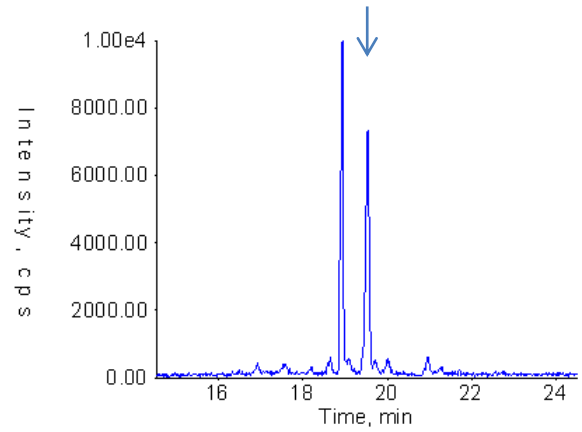
ブランク試料



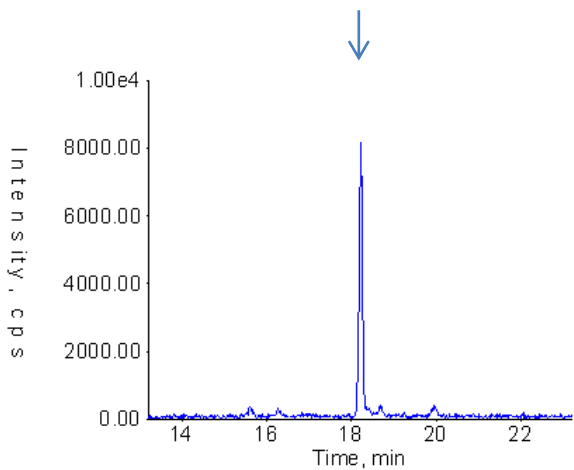
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.02 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.00005 mg/L)



標準溶液 (0.00005 mg/L)

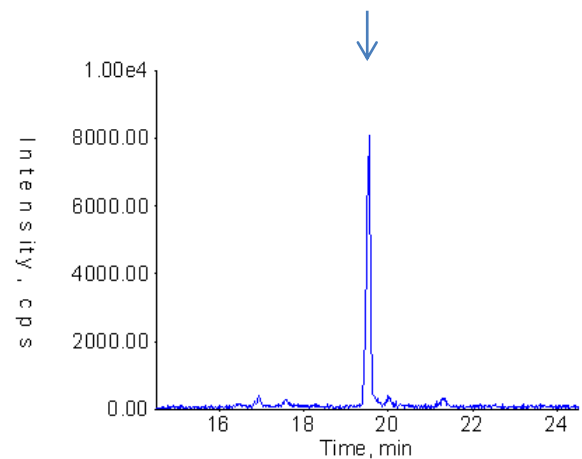
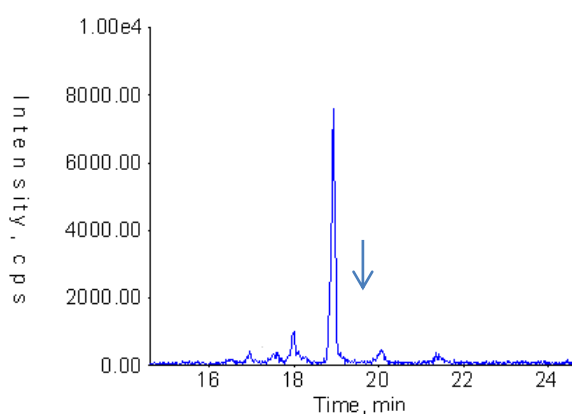
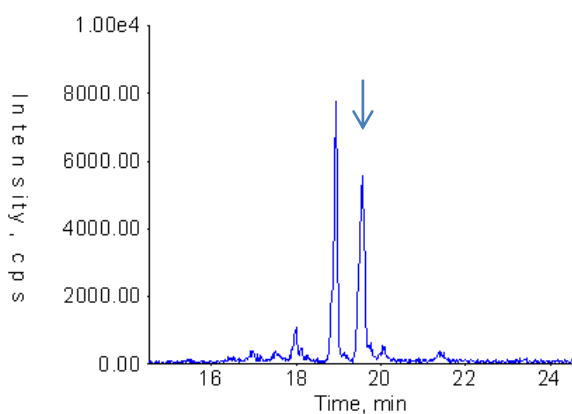


図 13 牛乳の SRM クロマトグラム (アミトラズ m/z +294.2→163.1)

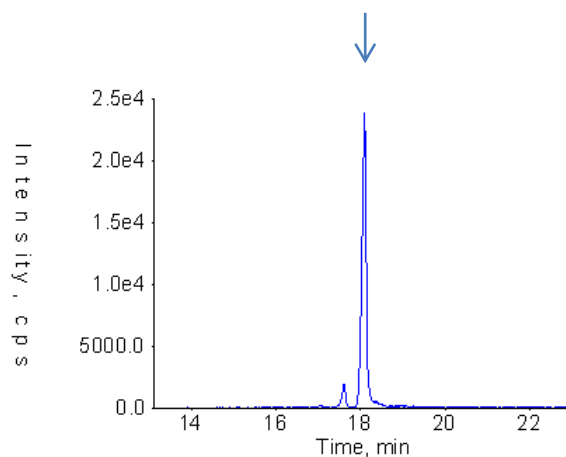
ブランク試料



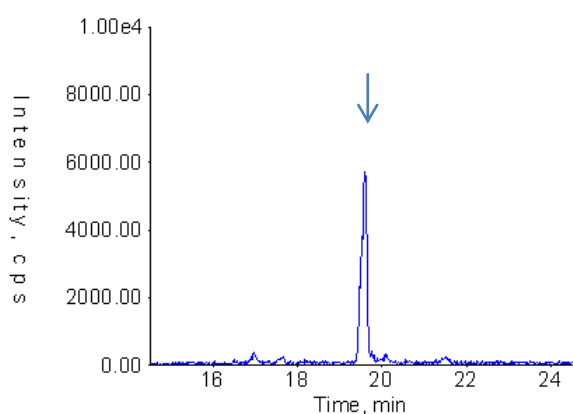
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.5 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.00005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

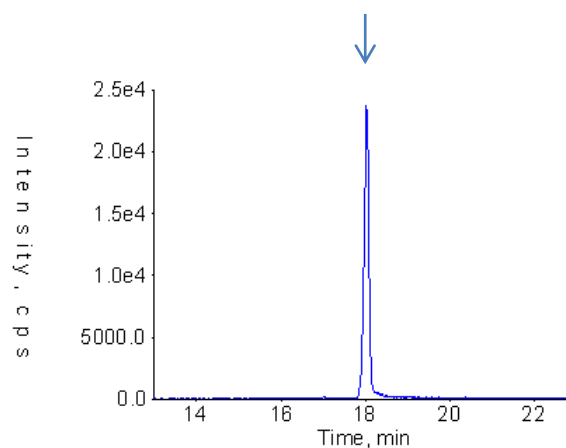
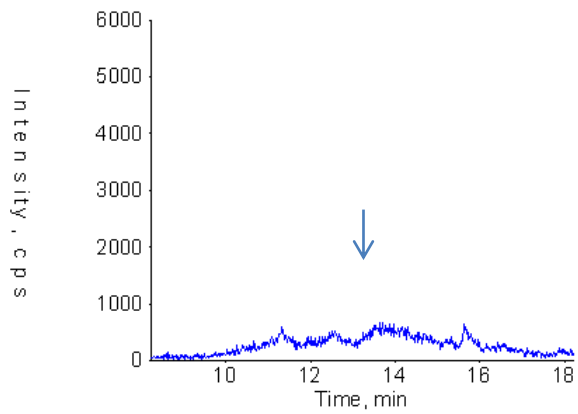
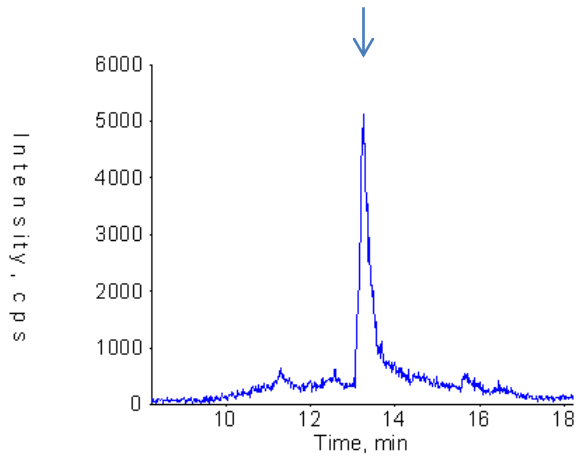


図 14 はちみつの SRM クロマトグラム (アミトラズ $m/z+294.2 \rightarrow 163.1$)

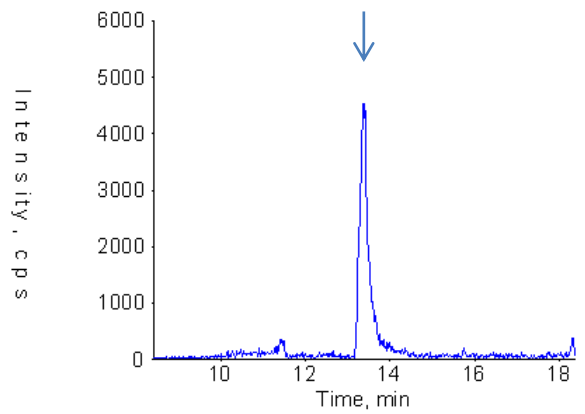
ブランク試料



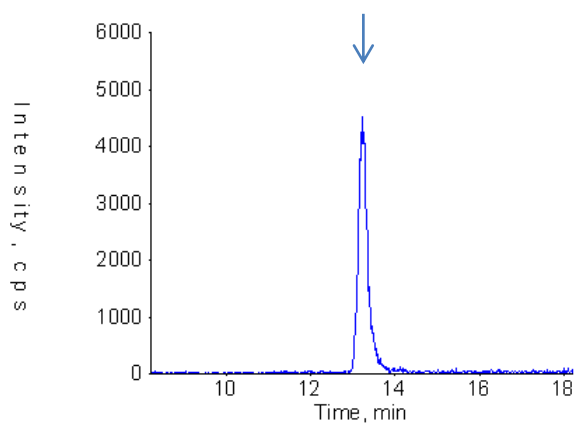
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.09 ppm 相当、10 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.00045 mg/L)

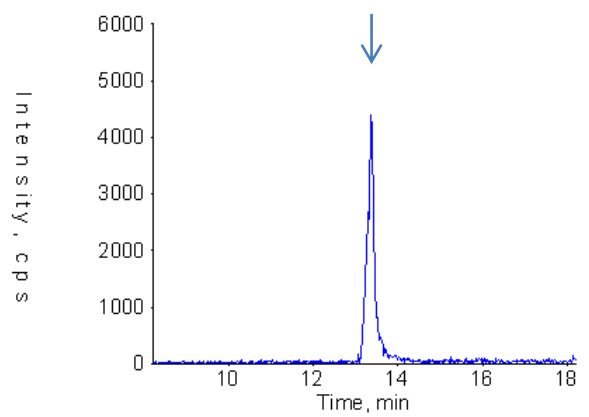
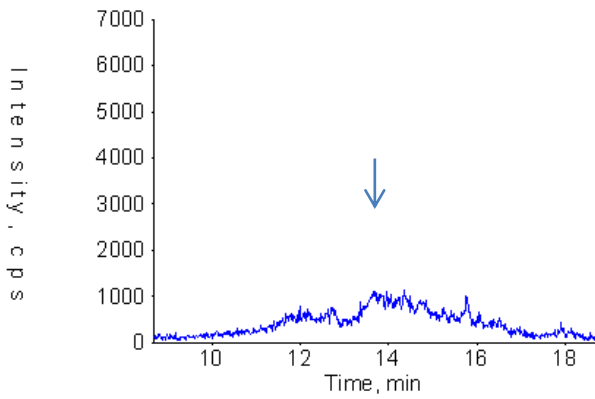
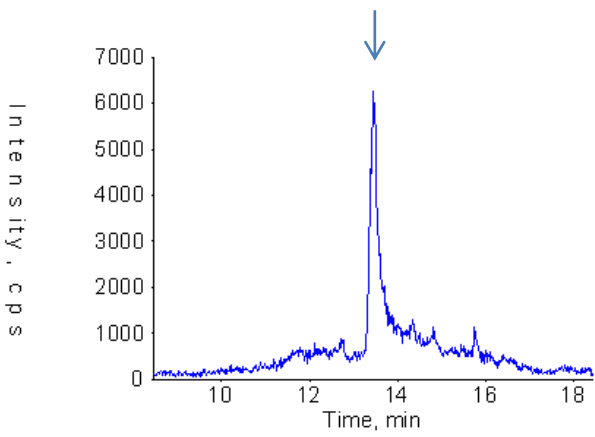


図 15 牛の筋肉の SRM クロマトグラム (代謝物 B $m/z +163.1 \rightarrow 122.0$)

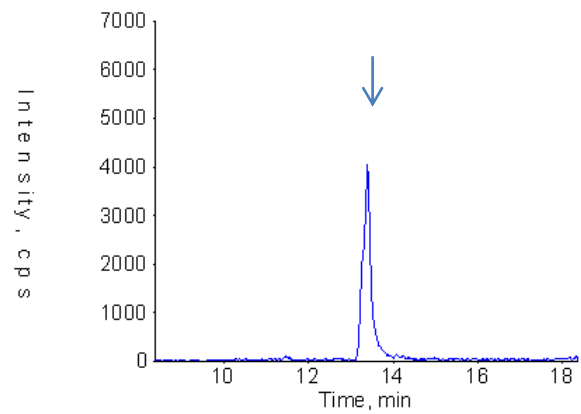
ブランク試料



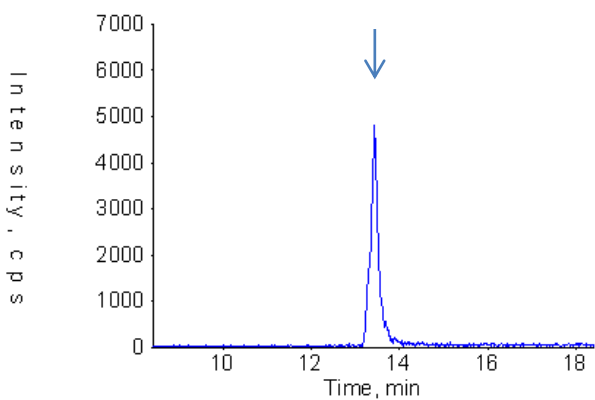
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、20 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

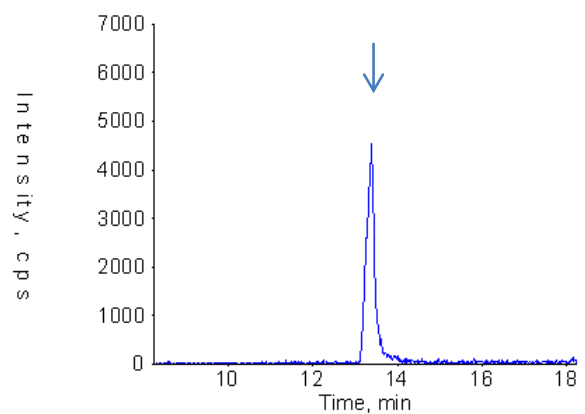
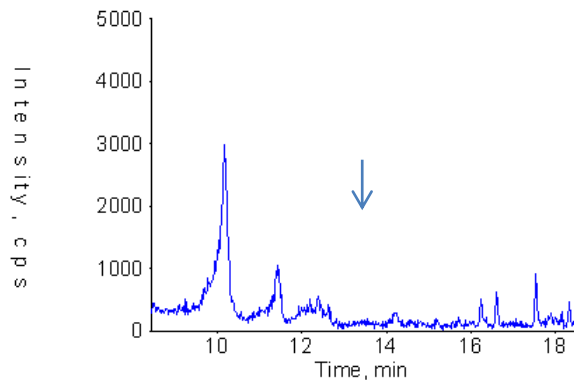
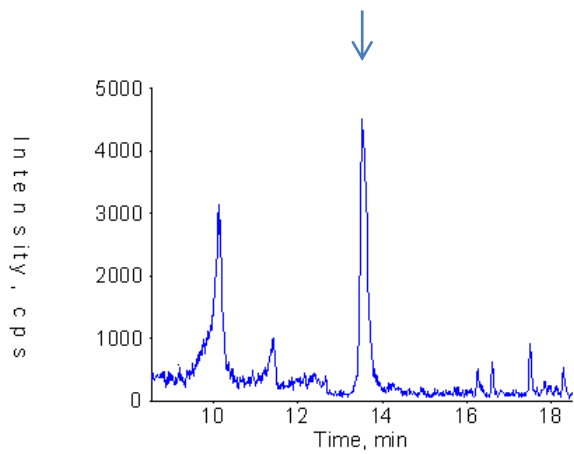


図 16 牛の脂肪の SRM クロマトグラム (代謝物 B $m/z +163.1 \rightarrow 122.0$)

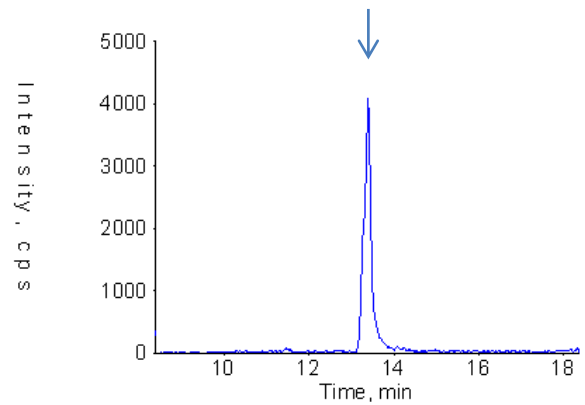
ブランク試料



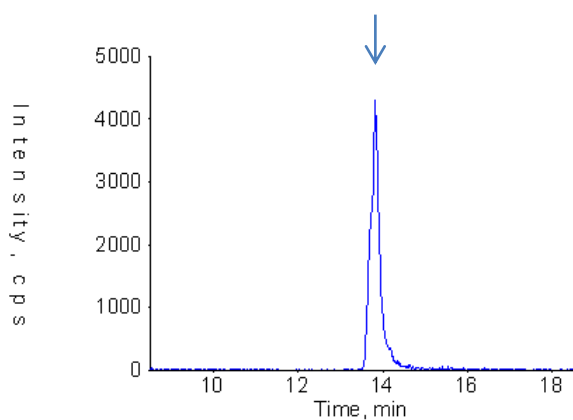
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.4 ppm 相当、50 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0004 mg/L)

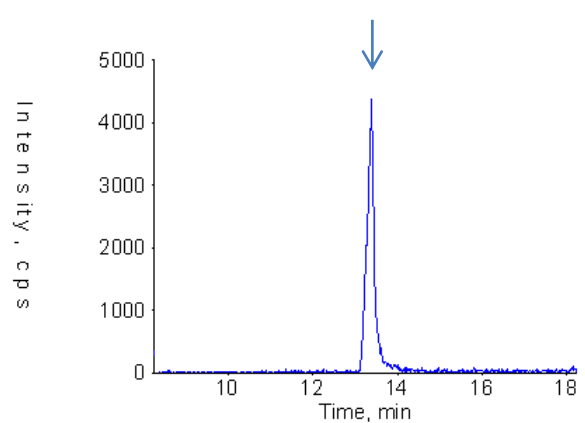
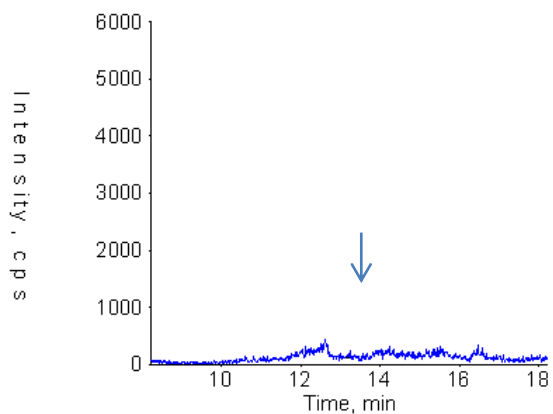
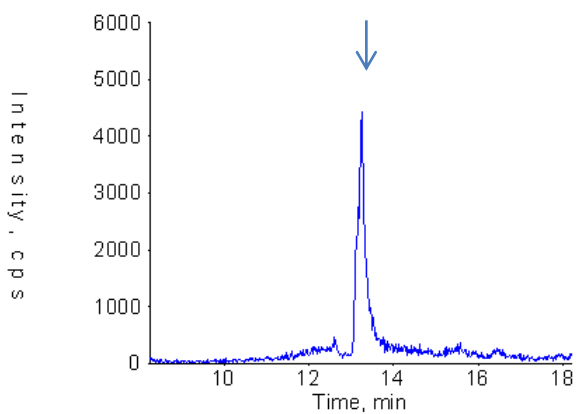


図 17 牛の肝臓の SRM クロマトグラム (代謝物 B $m/z +163.1 \rightarrow 122.0$)

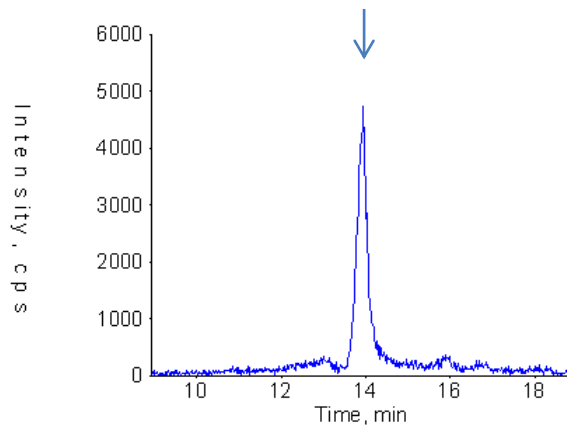
ブランク試料



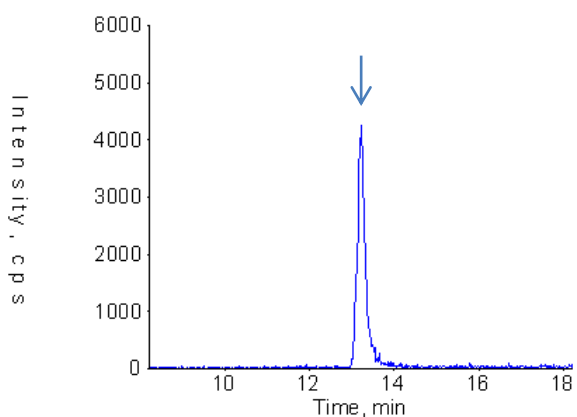
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.02 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

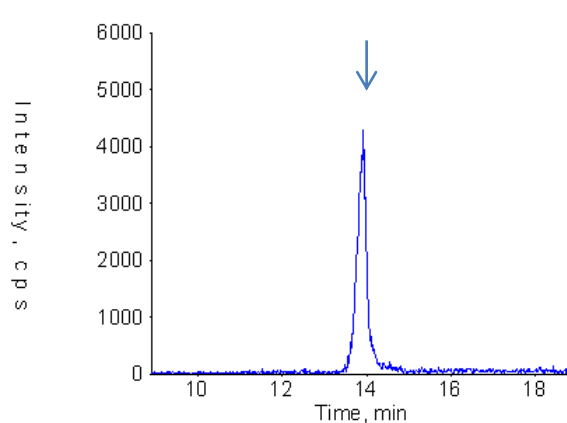
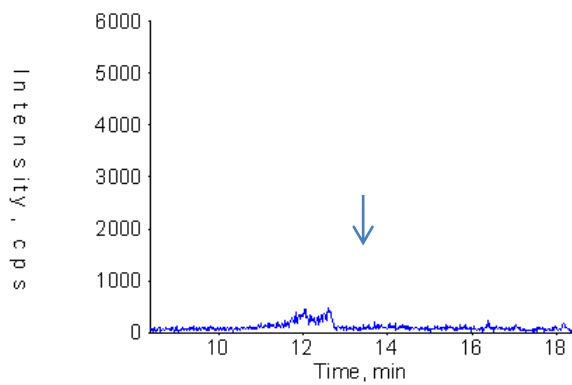
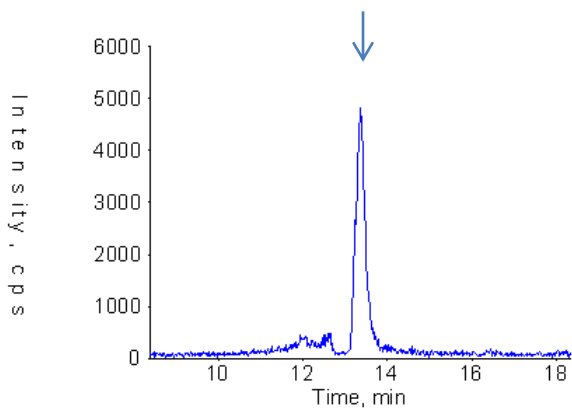


図 18 牛乳の SRM クロマトグラム (代謝物 B $m/z +163.1 \rightarrow 122.0$)

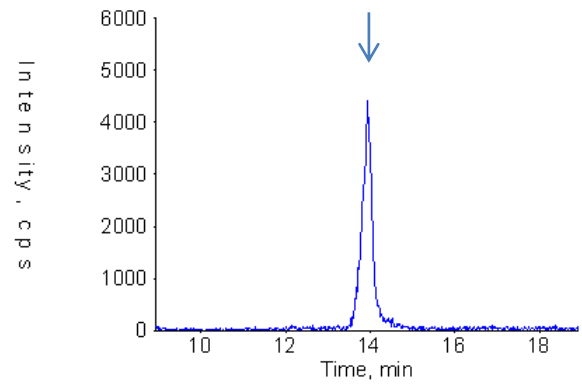
ブランク試料



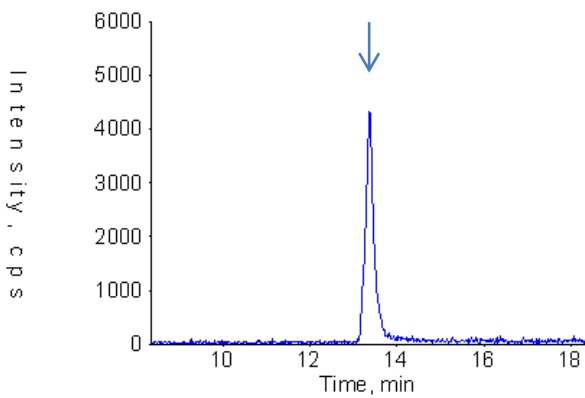
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、20 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

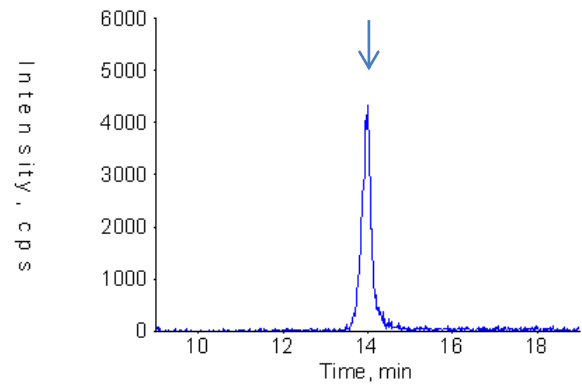
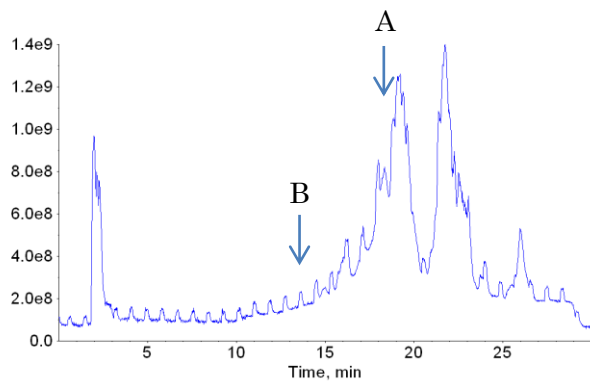
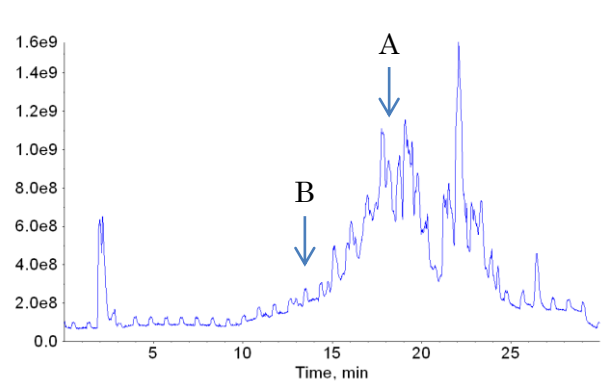


図 19 はちみつの SRM クロマトグラム (代謝物 B $m/z+163.1 \rightarrow 122.0$)

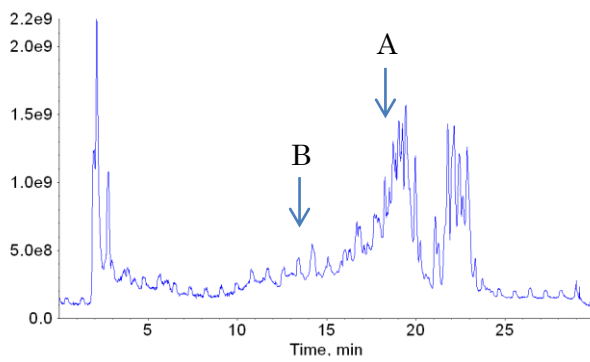
牛の筋肉



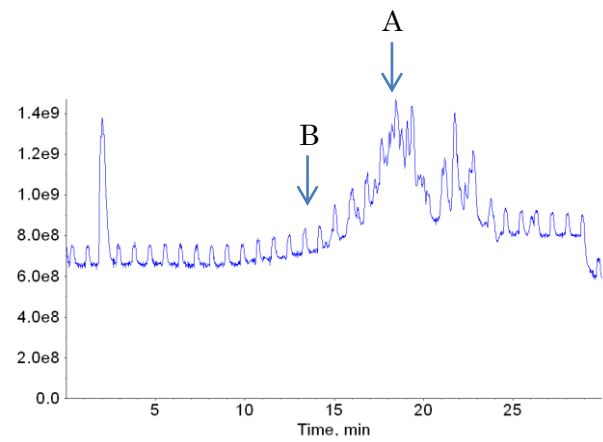
牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳



はちみつ

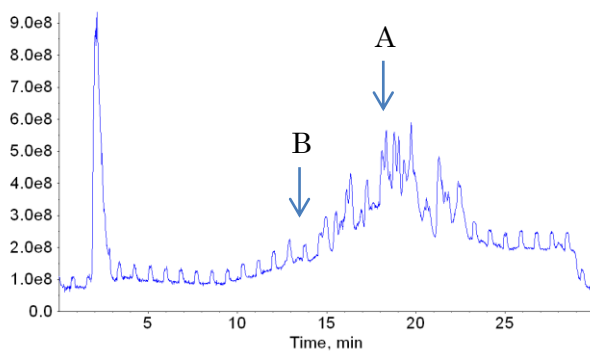


図 20 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～550 amu)
A：アミトラズ (保持時間：18分)
B：代謝物 B (保持時間：14分)